

Aus dem Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie
der Freien Universität Berlin

Direktor: Professor Dr. med. Bernhard Schmidt

Vergleichende Untersuchungen über die Verwendbarkeit und
Wertigkeit einer Bakterienzüchtungsmethode mit Kleinstge-
fäßen unter besonderer Berücksichtigung der Anwendbarkeit
bei der Bunten Reihe.

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an der

Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Dr. med. vet. Andreas Lübke, Tierarzt und approb. Arzt

aus Insel

1963

Aus dem Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie
der Freien Universität Berlin

Direktor: Professor Dr. med. Bernhard S c h m i d t

Vergleichende Untersuchungen über die Verwendbarkeit und
Wertigkeit einer Bakterienzüchtungsmethode mit Kleinstge-
fäßen unter besonderer Berücksichtigung der Anwendbarkeit
bei der Buntem Reihe.

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an der

Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Dr. med. vet. Andreas Lübke, Tierarzt und approb. Arzt

aus Insel

Dekan: Professor Dr. med. Bernhard S c h m i d t

Referent: Professor Dr. med. Bernhard S c h m i d t

Korreferent: Professor Dr. med. Willy Maassen



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 27.2.63

Inhaltsverzeichnis :

A Einleitung

I. Problemstellung und Definition

II. Literaturbesprechung

B Experimenteller Teil

I. Überlegungen

II. Eigene Untersuchungen

1. Material und Methoden

a) Technische Ausrüstung

b) Reinigung

c) Nährbodenbeschickung

d) Lagerung

e) Beimpfung

2. Vorversuche

a) Untersuchungen zur Frage der Austrocknung

b) Untersuchungen zur Frage der Aufstellung der Mikroröhrchen

3. Leistungsfähigkeit der Einsparmethode in der Bunten Reihe

a) Methodik

b) Ergebnisse

4. Wertigkeit der Methoden

III. Zusammenfassung

C Schrifttum

A Einleitung =====

I. Problemstellung und Definition.

Bei der zunehmenden bakteriologischen und serologischen Routinearbeit suchen Institute und Untersuchungsämter nach Methoden zur Vereinfachung und Kosteneinsparnis. Im bakteriologischen Labor steht hierbei vor allem die Nährbodenfrage im Vordergrund. Darüberhinaus kommt solchen Bestrebungen in Not- und Krisenzeiten eine gewisse Bedeutung zu. In anderen Fällen können besonders teure Zusätze zu biochemischen Differenzierungssubstraten wie ausgefallene oder nur in kleinen Mengen zu beschaffende Milch- oder Serumproben z.B. von kleinen Nagern oder von seltenen Versuchstieren die Verwendung kleinster Substratmengen erforderlich machen. Aus diesen allgemeinen und besonderen Gründen konnte es sich als notwendig erweisen, bakteriologische Kulturverfahren zu besitzen, die eine Einsparung von Substraten gewährleisten. Ein Weg zur Rationalisierung und Einsparung besteht in der Anwendung von Mikroverfahren. Mikromethoden werden allgemein angewendet bei serologischen Reaktionen und bei bakteriologischen Fragestellungen. Hier ist von Mikromethoden zu reden, die eine Einsparung bezwecken sollen und die in der Routine-Diagnostik vorwiegend zur Substitution der Bunten Reihe ausprobiert wurden. In diesen Methoden wurden zum Teil stark verkleinerte Kulturkammern verwendet, die stets für die jeweilige Methode entwickelt wurden und deren Spezificum bilden. Die Ergebnisse

können gleichzeitig von mehreren Personen ohne Hilfsmittel abgelesen werden. Neben der Substrateinsparung werden zusätzlich noch Brut- und Abstellraum, Glassachen und z.T. auch Stopfen für die Kulturgefäße eingespart. Diese Vorteile werden aber nicht durch zusätzliche Arbeiten, wie beispielsweise bei der Agaraufbereitung nach dem Kriege, die unter normalen Wirtschaftsbedingungen unrentabel ist, oder durch teure Zusatzgeräte oder durch besonders schwierige Handgriffe gewonnen.

II. Literaturbesprechung

Folgende Autoren haben derartige Mikroverfahren entwickelt. S e i f f e r t (58) arbeitet bei seiner Methode mit festen Nährböden, von denen sieben verschiedene tropfenweise in eine Petrischale gebracht werden. Die Austrocknung wird durch Umwandlung der Schalen in feuchte Kammern verhindert, indem sie umgekehrt auf feuchtem Fließpapier liegend bebrütet werden. In der Leistungsfähigkeit zeigt sich dieses Verfahren bei der Analyse von Bakterien der Typhus-, Paratyphus-, Ruhr- und Choleragruppe den Originalmethoden ebenbürtig. Auch werden Zeit und Arbeit eingespart, weil sich das Beimpfen der koagulierten Substrat-Tropfen schneller vollzieht als das Beimpfen der Röhrchen. Weitere Vorzüge bestehen in dem relativ frühzeitigen Auftreten der positiven Reaktionen, in der Reduzierung der Vorbereitungsarbeiten und in der Einsparung von Petrischalen.

K n o r r (34) verwendet 12 bis 13 cm lange, einseitig zugeschmolzene Glasröhrchen mit einem Durchmesser von 2 bis

3 mm; ihre Öffnung wird durch Einschmelzen des Glasrandes auf einen bis einen halben Millimeter eingeengt. Nach Beschickung der Kapillaren mittels einer Pravaz-Spritze wird sterilisiert und darauf durch Überschichtung mit sterilem Paraffin verschlossen. Die Beimpfung und Materialentnahme während der Bebrütung sind ohne wesentliche Beeinträchtigung der anaeroben Verhältnisse durch feine Glaskapillaren möglich. Es werden die besseren Resultate gegenüber der Verwendung desselben Nährsubstrates in anaerob bebrüteten Reagenzgläsern im allgemeinen und die Züchtung eines Stammes von *Spirillum sputigenum* im besonderen, die bis dahin in Reagenzgläsern nicht gelang, hervorgehoben.

W e s s e l i n o f f (69) verwendet Mikropipetten zur Nährbodeneinsparung bei der Bunten Reihe; nach Art der Glaskapillaren werden diese Kulturgefäße mühelos im Laboratorium hergestellt, mit einer kugelförmigen Ausweitung zur Aufnahme der Nährböden versehen und nach ihrer Impfung zugeschmolzen. Dem Prinzip nach erfüllt diese Methode neben wirtschaftlichen auch gute technisch-mikrobiologische Forderungen: Die Verwendung kleiner Nährbodenmengen, Einsparung von Verschlußstopfen, von Reagenzglasständern und von Lagerraum, absoluten Schutz gegen Austrocknung und qualitative Kontrolle der Gasbildung ohne zusätzliche Maßnahmen. Der Wert dieser Methode in der vorliegenden Form wird jedoch erheblich eingeschränkt durch die Unmöglichkeit, quantitativ arbeiten zu können, durch die unbequeme Entnahme von Material zur weiteren bakteriologischen Verarbeitung und durch eine

Behinderung des Gasaustausches. Der stopfenlose Verschuß, der einerseits einen großen Vorzug dieser Methode darstellt, bedingt andererseits die Einschränkung ihrer breiten Anwendung.

S e i d e l (57) ersetzt die Bunte Reihe durch eine Mikromethode, die dem Prinzip nach eine maßstabsgerechte Verkleinerung der S c h i l l ' schen (54) Doppelreagenz - glasmethode ist; ihre Ergebnisse sind denen der Originalmethode adaequat. Der Farbumschlag tritt häufig früher auf, was nach Ansicht des Autors durch ein gegenüber der Originalmethode günstigeres Verhältnis von Bakterieneinsaatmenge zu Nährbodenvolumen bedingt ist. Die Mikroröhrchen werden mit ungraduierten Spezialpipetten beschickt. Als Vorzug besitzt diese Methode eine gute Handlichkeit, und sie spart gegenüber der Originalmethode 9/10 des Nährbodens ein. Auch können mühelos allzeitig Material zur Weiterverarbeitung entnommen und Reagenzien hinzugegeben werden. Das wichtige Problem der Ein- und Austrocknung bei mehrtägigem Brutschrankaufenthalt wird vom Autor nicht diskutiert.

Von den bisher aufgeführten und in der Routinediagnostik verwendeten Mikroverfahren ist die Gruppe der eigentlichen Mikrokulturverfahren abzutrennen, die sich mit dem mikroskopischem Studium lebender Organismen befaßt und zu deren Kultur kleinste Mengen flüssiger oder fester Substrate verwendet werden. Hier ist die Nährbodeneinsparung nicht das Ergebnis der primären Zielsetzung, sondern die Folge der für diese Verfahren erforderlichen Technik infolge

ihrer zum Teil kleinsten Kulturgefäße mit Inhalten bis unter 1/1000 Kubikmillimeter. Für die Routinediagnostik ist diese Gruppe ungeeignet, weil die Anlage der Kulturen relativ viel Zeit erfordert, und weil sich Nährböden mit Indikatorzusätzen nicht mehr gut verwenden lassen, da infolge der geringen Schichtdicke der Substrate die Beurteilung unsicher ist. Deshalb wurde teilweise der Versuch unternommen, durch Konzentrationserhöhung des Indikators kräftigere Reaktionen bei Nährböden der Bunten Reihe zu erzielen (57).

In diesem Zusammenhang sind folgende Autoren zu nennen, die eigentliche Mikrokulturverfahren entwickelt oder modifiziert haben:

Von K i s s k a l t (33) wird eine aerobe Oberflächenkulturtechnik in Verbindung mit der Burrischen Tuschemethode beschrieben; die Austrocknung wird durch eine Vaselineabdichtung verhindert, die zwischen Hohlschliffobjektträger und dem den hängenden Agartropfen tragenden Deckglas angebracht ist. Dieses Verfahren wird durch die Deckglaskultur nach F o r t n e r (14), als deren Vorläufer sie angesehen werden kann, ersetzt. Diese hat für Lehre und Forschung u.a. wegen ihrer relativ einfachen Ausführung eine Bedeutung gewonnen. An die Stelle des Agartropfens tritt ein dünnes Agarhäutchen, das auf seiner dem Ausschliff des Objektträgers zugekehrten Seite die Kultur trägt; ihre Beobachtung ist selbst mit Ölimmersionslinsen möglich. Die Austrocknung wird ebenfalls durch Vaselineabschluß verhindert. Mit dieser Methode lassen sich auch anaerobe Kulturen züchten, wenn

gleichzeitig *Prodigiosus*-keime mit in der Mikrokammer bebrütet werden.

Ein im Prinzip ähnliches Verfahren ist zuvor von *Hennberg* (21) in der Gärungsindustrie entwickelt und von *Lindner* (39) später bestätigt worden.

Als Modifikationen der Fortnerschen Deckglaskultur können die von *Dimitrijewic-Speth* und *Kitschewaz* (7) einerseits und die von *Wamosscher* und *Vásárhelyi* (67) andererseits verwendeten Methoden angesehen werden; da sie technisch komplizierter und auch nicht leistungsfähiger sind, haben sie keine breitere Verwendung gefunden.

Von *Wright* (70) wird eine sehr einfache Deckglaszelle mit einem Lumen von etwa 30 Kubikmillimeter in der Verwendung als Kulturkammer, zur Beurteilung bactericider Versuche und als Zählkammer für rote und weiße Blutzellen angegeben. Die Kammer besteht aus einem einfachen Objektträger, auf dem als Auflage für das Deckglas rahmenartig ein Vaseline-wall angebracht ist, der mit einer Kante des Deckglases gelenkartig verbunden ist. *Meissner* (43) modifiziert diese Kammer, indem er gleichzeitig mehrere Kammern zwischen zwei Objektträger anordnet, deren Abstand durch paraffinierte Papierstreifen auf 1/2 Millimeter eingestellt ist.

Weinberg und *Séguin* (68) beschicken fadenförmig ausgezogene Glaskapillaren mit Muskellymphe gestorbener Meerschweinchen, die mit Gasbranderregern

infiziert wurden, um deren Sporulation und Beweglichkeit zu beobachten. S t u r g e s (62) dagegen verwendet abgeplattete Glaskapillaren, um die an gekrümmten Oberflächen bei der Mikroskopie störend auftretenden Lichtbrechungen auszuschalten; ihr Lumen ist 30 - 40 μ breit und 5 μ hoch, es kann mit der Ölimmersion betrachtet werden und es wird durch Abschmelzen beider Enden verschlossen.

C o m m a n d o n und d e F o n b r u n e (3) arbeiten mit einer Ölkammer, deren Lumen wahlweise bis unter 1/1000 Kubikmillimeter verkleinert werden kann. Mittels einer sehr dünn ausgezogenen Pipettenspitze deponieren sie die infizierte Kulturflüssigkeit unter einen Paraffinöltropfen, der auf einem Objektträger lagert. Die stärkere Haftfähigkeit von der Bouillon auf Glas gegenüber der des Paraffins bedingt es, daß die Stabilität der Tropfenkultur beim Entfernen der Pipette erhalten bleibt. Aerobe Kulturen können bis zu mehreren Monaten aufbewahrt werden; sie trocknen nur aus, wenn der Ölmantel sehr dünn gehalten wird. Der große Vorteil dieser Tropfenkultur besteht in der Verwendung von Ölimmersionssystemen, in der jederzeit möglichen Keimentnahme, in der Nährbodenmodifikation mittels Pipette, in der Möglichkeit von Vitalfärbungen und in der Verwendung eines Mikromanipulators.

Neben den Mikromethoden wurden Makroverfahren zur Einsparung fester Substrate entwickelt, was einmal durch bessere Ausnutzung der Oberfläche infolge einer Trichterform (50), eines Rundumnährbodens (18) oder durch Unter-

teilung (9,26) möglich ist und zum anderen durch Reduzierung der Passagezahl erreicht wird, indem die Austrocknung, die Nährbodenerschöpfung und die Anreicherung von Stoffwechselprodukten als diejenigen Faktoren ausgeschaltet werden, die ein vorzeitiges Absterben der Kulturen bedingen. Hinsichtlich der Ausschaltung bactericider Stoffwechselprodukte und der schnellen Erschöpfung der Nährböden sind L u m i è r e (42), der mit Vaselineoel überschichtet, und U n g e r m a n n (66), der Kaninchenserum mit Paraffinoel abdeckt, zu nennen; diese beiden Verfahren wurden im Laufe der Jahre von anderen Autoren bestätigt oder aus wirtschaftlichen Erwägungen modifiziert (2, 10, 15, 32, 44, 47, 65). Außerdem haben sich mit der Methode der Dauerkultur H o w a r d (24), der eine bei -10° C gelagerte 15%ige Glyzerinbouillon einführt, und D i k o m e i t (6), der mit einem speziellen Konservierungsnährboden aus gleichen Teilen Lanolin anhydricum und Paraffinoel Colibakterien sieben Jahre lebensfähig erhielt, beschäftigt.

Ein besonderes Problem für die Nährbodeneinsparenden Methoden stellt die Austrocknung dar, die noch dadurch kompliziert wird, daß bei strengen Aerobiern z.B. Tbc-Kulturen (11, 23, 64) für zusätzliche Luftzufuhr gesorgt werden muß, die ihrerseits die Austrocknung unterstützt. Folgende Autoren haben sich zum Problem der Austrocknung geäußert. Bei der Anlage von Stammsammlungen wurde die Austrocknung der Kulturgefäße durch Verkitten (60),

Abschmelzen (37) und Überziehen des Stopfens mit Firnis (5) ausgeschaltet. Hierauf gründen sich dem Prinzip nach die meisten späteren Verfahren, bei denen verschiedene Kunststoffe als Verschuß ausprobiert wurden. So wird Hartparaffin in geschmolzener Form (29, 46, 54, 61), in Form von Paraffinscheiben (36) und als fabrikmäßig in verschiedenen Größen hergestellter Paraffinpfropf (59) zum Verschuß verwendet.

Aus Gründen größerer Sauberkeit und wegen eines wirksameren Austrocknungsschutzes wurde das Hartparaffin durch Siegellack (40, 41), durch Siegelwachs (51), durch feuerfeste Wasserglasstopfen (1), durch Cofferdam mit kapillären Stanzlöchern (22), durch einen Metallverschluß einer Legierung mit niedrigem Schmelzpunkt (16), durch Zelloidinlösung (12), durch Plastillin (11, 38, 41), durch Cellophan (63) ersetzt. S c h i l l (54) führt neben dem Stopfen den Reagenzglaskappenverschluß ein und prägt damit den Begriff des Doppelreagenzglases, wobei ein zweites größeres Reagenzglas über das gewöhnliche Reagenzglas gestülpt wird. Bei geringer Austrocknung ist ein ausreichender Gasaustausch möglich; da die Spaltöffnung abwärts zeigt, können Luftkeime nicht in ihn eindringen. Ebenfalls ist kein Durchwachsen von Schimmelpilzen möglich.

Das Doppelreagenzglas wird von einigen Autoren in modifizierter Form verwendet (13, 20, 25, 30, 41), von anderen wird das als Kappe gebrauchte zweite Reagenzglas durch eine Aluminiumkappe (28), durch einen Aluminiumdeckel (48) oder durch eine Gummikappe (55) ersetzt. Für die

langfristigen sauerstoffbedürftigen Tbc-Kulturen wird zur Gasdiffusion ein relativ großer, jedoch sicher abgeschlossener Luftraum durch ein vergrößertes Reagenzglas (45) oder durch ein zusätzliches Mantelrohr (17) geschaffen; im letzteren Falle wird der Wasserverlust auf 3 bis 4 % reduziert, während die achtwöchigen Kontrollen mit Kapsenberg-Kappen 35 bis 38% Gewichtsverlust anzeigen.

D o l d (8) führt mit einem Wasserverschluß ein neues Verschlußprinzip ein, indem feste Reagenzglaskulturen zur Einsparung der Stopfen mit der Öffnung in flache Wasserbäder gestellt werden, die Sublimatzusätze enthalten, um abfallende Keime abzutöten. Als Austrocknungsschutz findet die feuchte Kammer Verwendung, die

D a h m e n (4) durch einen planen Verschluß modifiziert, der die starke Luftwirbelbildung ausschaltet, die beim Abheben der gebräuchlichen schalenförmigen Deckel entsteht und die oftmals zu unerwünschten Infektionen führt.

B Experimenteller Teil

I. Überlegungen

Die eigene Arbeit beschäftigt sich mit der Entwicklung eines Mikroverfahrens, das nicht nur den bereits erprobten Mikromethoden (34, 57, 58, 69) hinsichtlich der Einsparung von Substraten und der Genauigkeit der Kulturergebnisse gleichwertig ist, sondern das darüberhinaus durch Einführung einer neuen Substratanordnung die den Mikromethoden anhaftenden Nachteile beseitigt; letztere werden bedingt durch die einseitige Verwendung flüssiger oder fester Substrate, durch die Unmöglichkeit einer quantitativen Gasschätzung oder das Fehlen einer diagnostisch verwertbaren Gerinnung oder Verflüssigung, durch die zum Teil schnelle Austrocknung, durch die erschwerte Entnahme von Kulturproben und Zugabe von Reagenzien. Außerdem werden Ergebnisse angestrebt, die nach dem Originalverfahren unter den gleichen Versuchsbedingungen nicht möglich sind; das sind eine Gasschätzung in allen flüssigen Substraten, für die beim Originalverfahren stets ein zusätzliches Gas auffangröhrchen erforderlich ist und die Verarbeitung von Material, das nur in kleinen Mengen zur Verfügung steht, z.B. Milch- und Serumproben kleiner Säugetiere.

Das Prinzip der neu entwickelten Methode, die als Einsparmethode bezeichnet wird, besteht in einer Art Aufhängung flüssiger Substrate in Mikroröhrchen, die in Form und Größe einem Durhamröhrchen gleichen und mit der Öffnung nach unten aufgestellt werden. Die Stabilität

der Substratanordnung wird durch eine Glasperle unter Ausnutzung von Kapillarkräften gesichert.

Im Sinne einwandfrei ablesbarer Umschlagsreaktionen erweist sich ein stark verkleinertes Kulturgefäß in Form eines Durhamröhrchens für die Einsparung flüssiger und fester Nährböden als besonders geeignet; Reinigung und quantitatives Arbeiten sind hierbei ohne Einführung schwieriger Handgriffe gewährleistet. Die Durhamröhrchen könnten durch einen Stopfen oder eine Kappe verschlossen werden; allerdings würde diese Verschlusmöglichkeit infolge der kleinen Abmessungen der Öffnungen keine Vereinfachung hinsichtlich der Vorbereitungen, Beschickung, Beimpfung und Materialentnahme mit sich bringen. Eine Arbeitsvereinfachung wird aber neben der Nährbodeneinsparung mit als Hauptziel angestrebt. Deshalb soll für die Einsparmethode ein bisher bei flüssigen Kulturen nicht ausprobiertes Prinzip Verwendung finden, in dem der Ständer die Verschlussfunktion mit übernimmt. Dazu muß das Durhamröhrchen mit nach unten zeigendem Mundstück aufgestellt werden, gleichsam wie ein gefülltes senkrecht stehendes Reagenzglas, das auf den Kopf gestellt wird und dabei auslaufen würde. Auch ein Durhamröhrchen würde auslaufen, allerdings langsam, weil hier bereits Kapillarkräfte mit einer Bremswirkung auftreten, die im Falle echter Kapillaren das Substrat fixieren und nicht herabfließen lassen würden. So besteht die Aufgabe darin, eine Anordnung zu finden, durch die in Durhamröhrchen Kapillarkräfte so stark wirksam werden, daß das Herabfließen ihres Nährbodens analog echten Kapillaren verhindert wird. Das

gelingt durch Anbringen einer Glasperle in der Oberfläche der Flüssigkeit, wodurch ein sichelförmiger echter kapillärer Spalt geschaffen wird, dessen Kapillarkräfte zusammen mit dem atmosphärischen Druck die Stabilität der Substratanordnung sichern. Dadurch wird bei jeder Kultur, die Gas bildet, eine vergleichsweise Gasschätzung möglich und es fallen auch die Stopfen weg, weil die Röhrchenöffnung gleichzeitig durch den Ständer verschlossen wird. Weiterhin werden durch die Glasperle die Verflüssigung und die Koagulation nachgewiesen, je nachdem ob die Perle beim Schwenken der Röhrchen eine Rollbewegung ausführen kann oder fixiert bleibt.

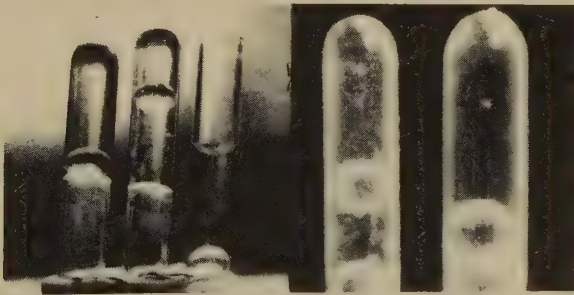
Auch für feste Substrate soll eine einfache Beschickungsmethode ausprobiert werden, wodurch für die Mikromethode prinzipiell dieselben Substrate wie für das Originalverfahren verwendet werden könnten.

Weiterhin sollen die beschickten Röhrchen austrocknungsicher durch eine einfache Lagerung in Reagenzgläsern, Stuhlröhrchen oder in kleinen Petrischalen monatelang vorrätig gehalten werden. Vor der Beimpfung sollen sie im Dampftopf sterilisiert werden können, ohne daß die Substrate auskochen oder durch Kondenswasser verwässert werden.

In Parallelversuchen mit der originalen Bunten Reihe soll festgestellt werden, ob diese Einsparmethode grundsätzlich funktioniert, ob ihre Ergebnisse denen des Originalverfahrens gleichwertig, überlegen oder unterlegen sind, welche Substrate verwendet und empfohlen werden können

und welche Anwendungsgebiete sich unter normalen Arbeitsbedingungen und in Notzeiten ergeben.

In der praktischen Durchführung wird dabei das Durhamröhrchen bis maximal zur Hälfte mit flüssigem Substrat beschickt, in das zusätzlich eine Glasperle getan wird, die nach unten auf den Röhrchenboden sinkt. Wird das Mundstück des Röhrchens jetzt nach unten geschwenkt, so bildet sich sofort eine konkave Oberfläche der Flüssigkeit, durch deren zeitbedingte Stabilität ein spontanes Herabfließen verhindert wird. Die Glasperle rollt dabei langsam, weil gebremst durch den Reibungswiderstand des Substrates, von dem jetzt nach oben zeigenden Röhrchenboden bis zur konkaven Oberfläche hinab und wird hier in ihr fixiert.



Die dabei wirksamen physikalischen Kräfte lassen sich wie folgt beschreiben:

Die Summe des Gewichts der Flüssigkeitssäule oder des Nährbodens und der Kugel wird im Gleichgewicht gehalten von der Summe der Kräfte, die auf Grund der Druckdifferenz angreifen, d.h. Luftdruck $\times$ Querschnittsfläche

drückt nach oben und Gewicht des Nährbodens $\times$ Querschnittsfläche drückt nach unten. Zusätzlich wirken Kapillardrucke zwischen der Oberfläche der Perle und der Innenfläche des Durhamröhrchens. Die Perle soll verhindern, daß Luft in den oberen mit der Kulturflüssigkeit aufgefüllten Teil des Röhrchens aufsteigen kann, wodurch die Druckdifferenz aufgehoben und die Flüssigkeitssäule nicht mehr gehalten werden.

Eine derartige Zerstörung der Substratanordnung, in der die Kugel als wesentliches Element der Einsparmethode nicht vorhanden ist, zeigen in den Hauptphasen ihres Ablaufes die Aufnahmen: Substrat mit zeitbedingter konkaver Oberfläche, randseitige Durchbiegung der Oberfläche, langsames schleierartiges Herabfliessen der Flüssigkeit und Aufsteigen der Luft im Verhältnis zum herabgeflossenen Substrat.



II. Eigene Untersuchungen

1. Material und Methoden

a) Technische Ausrüstung

Zur speziellen Ausrüstung der Einsparmethode gehören Mikroröhrchen aus Jenaer Glas, Mikropipetten, Glasperlen und Ständer für die Kulturgefäße.

Mikroröhrchen:

Länge 2,5 cm. Lichter Durchmesser 0,3 cm. Wandstärke 0,1 bis 0,05 cm. Öffnung horizontal und plan geschliffen.

Mikropipetten:

Übliche Pipetten der Größe 0,1 bis 5,0 (auch solche mit abgebrochenen Spitzen). 0,1-Pipette für quantitative Beschickung bei der Reimpfung. 1,0-Pipette für flüssige Substrate. 1,0 - und 5,0-Pipette für feste Substrate. Die Spitzen werden in Stärke einer Bleistiftmine über der Bunsenbrennerflamme ausgezogen. Die Kaliber für feste Nährböden können etwas weiter gehalten werden, damit der Agar nicht so schnell abkühlt. Länge der Spitze 3,5 cm; in jedem Fall muß mit der Spitze der Röhrchenboden berührt werden können, ohne daß dabei der konische Übergangsteil die Röhrchenöffnung verschließt, damit die Luft aus dem Mikroröhrchen entweichen kann, wenn das Substrat einfließt. Das Spitzenende muß glattrandig sein, weil sonst beim Einfüllen Luftblasen entstehen können. Bei der 0,1 Pipette kann an Stelle der Glasspitze die Nadel einer Injektionskanüle Nr.14 ein-

geschmolzen werden. Die Spitzen können hier kürzer sein, weil sie lediglich zur Einsaat von Impfmateriäl verwendet werden.

Zum Beschicken flüssiger Substrate hat sich eine 2,0-Rekord-Spritze mit Kanülen der Nr. 12 und 14 sehr gut bewährt; für feste Substrate ist sie nicht geeignet.

Glasperlen:

Die Glasperlen werden üblicherweise in bakteriologischen Kugelmöhlen verwendet. Bei der Auswahl der Perlen muß auf Form und Größe geachtet werden. Es dürfen keine Perlen mit ausgeprägter Tropfenform verwendet werden, weil sie keine sichere Fixation der Substrate ergeben oder weil sie sich beim Erhitzen im Autoclaven in den Mikroröhrchen festklemmen können. Deshalb sind bereits in einer Kugelmühle rundgeschliffene Perlen besonders geeignet. Die Größe der Perle ist ebenfalls für die Stabilität der Substratanordnung wichtig. Der Abstand der Perlenoberfläche von der Röhrchenwand soll 0,5 bis 0,75 mm betragen. Zu kleine Kugeln bedingen eine schlechte Fixation der Substrate und zu große Kugeln können die konkave Flüssigkeitsoberfläche und dadurch ebenfalls die Substratanordnung zerstören, wenn sie in die Fixationslage rollen.

Bei der Anlage von Substraten, die auf Verflüssigung oder Gerinnung geprüft werden, das sind Gelatine, Milch- und Plasmasubstrate, ist eine zweite kleinere Glasperle von etwa 1 1/2 mm Durchmesser



erforderlich. Sie liegt innerhalb der Flüssigkeit auf der Fixationsperle, die ihrerseits einen Teil der Oberfläche bildet und dadurch mit dem lufthaltigen Raum des Röhrchens in Berührung kommt.

Die kleinere Perle erfüllt eine doppelte Aufgabe. Einmal soll sie durch die Rollbewegung oder durch die Verlangsamung oder Verhinderung dieser Bewegung die Gerinnung prüfen, und zwar bei Milchsubstraten dann, wenn sich eine Rahmschicht absetzt; diese steigt beim Schwenken der Röhrchen wie eine Wasserblase in der Wasserwaage sofort und schnell nach oben und stoppt dadurch die größere Fixationsperle in den Anfängen ihres Abwärtsrollens, während die kleinere Perle nicht gestoppt wird, weil sie unter der Rahmschicht durchläuft. Mit der großen Perle allein wäre in solchen Fällen keine Gerinnungsbeurteilung möglich. Zum anderen verändert die kleinere Perle ihre Lage auch dann noch, wenn die Fixationsperle durch Bakterienrasen festgehalten wird, die als Oberflächenhäutchen wachsen.

Mikroröhrchenständer:

Für die Aufstellung der Kulturröhrchen werden besondere Ständer benötigt, die gleichzeitig eine Verschlusfunktion mit auszuüben haben. Prinzipiell müssen die beimpften Kulturröhrchen aufrecht stehen, damit das Gas in der Röhrchenkuppe aufgefangen und die Glasperle fixiert werden kann, was bei einer Horizontallagerung nicht möglich ist. Da bezüglich der Beobachtungszeit und des Sauerstoffbedürfnisses unterschiedliche Kulturbedingungen vor-

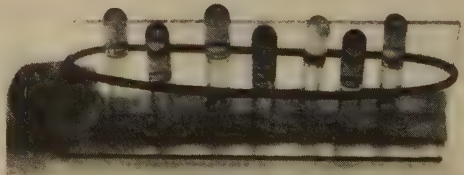
liegen, werden mehrere Modelle entwickelt, die z.T. schnell und billig herzustellen sind und wegen ihrer kleinen, nicht sperrigen Formen sehr gut in der feuchten Kammer aufgestellt werden können. Deshalb können auch Kulturen beobachtet werden, für die mehrere Wochen lang eine günstige Sauerstoffdiffusion geschaffen werden muß.

Folgende Ständer werden deshalb ausprobiert:

Holz- (Metall-)Leukoplastständer: Er besteht aus einem 30 cm langen, 1,5 - 2 cm breiten und 0,3 cm starken Brettchen. Zur Aufnahme der Mikroröhrchen sind 20 Durchbohrungen im Abstand von 1,5 cm eingelassen. Die Durchbohrungen werden einseitig mit einem durchgehenden Leukoplaststreifen verschlossen, der jederzeit insgesamt oder abschnittsweise auswechselbar ist. Die Mikroröhrchen werden in die einseitig offenen Löcher gesetzt und zum Verschließen auf das Leukoplast gedrückt. Durch den Holzrahmen wird ein sehr fester Stand der Röhrchen erzielt. Das Holzbrettchen kann durch ein durchbohrtes Band Eisen ersetzt werden, das wegen seiner besseren Standfestigkeit schmaler sein kann.

Improvisierter Leukoplastständer:

Als Improvisorium kann Leukoplast auch allein in Verbindung mit einem Objektträger verwendet werden.



Dieser wird mit der Längskante auf die Mittellinie eines Leukoplaststreifens aufgedrückt und zur Verhinderung

des Umkippens wird auf die eine Glaskante ein Wachssokkel aufgedrückt. Die Mikroröhrchen werden alternierend an beiden Seiten des Objektträgers aufgestellt und durch einen darübergelegten Gummiring gegen den Objektträger gedrückt. Ohne Gummiring würden die Röhrchen umkippen, weil das Leukoplast bei 37°C nachgiebig wird.

Bienenwachsständer:

Er ist einfach herzustellen, indem das verflüssigte Wachs in einer Schichtdicke von mindestens 0,5 cm ausgegossen wird. Die Platten werden in schmale Streifen geschnitten und durch Erwärmen auf Objektträger aufgeklebt. Das flüssige Wachs kann auch direkt in flache Deckel gegossen werden, z.B. Metallschachteln oder Petrischalen. Zum Aufstellen wird das Röhrchen in das vorgewärmte Wachs etwa 3 mm tief eingedrückt. Die Röhrchen können jederzeit aus dem Ständer entnommen werden. Bei senkrechter Herausnahme werden die Öffnungen nicht durch Wachs verschlossen, wenn es aber verkantet und mit leichter Drehung herausgehoben wird, dann bleibt die Öffnung durch den eingestanzten Wachskegel verschlossen. Analog zum Bienenwachs können Plastilin, die von Woratz (71) entwickelte knetbare Masse und Stearin verwendet werden.

Plastilinständer:

Plastilin wird als einreihiger, 1 cm breiter, 0,8 cm hoher balkenartiger Sockel auf Objektträger oder andere Glasstreifen aufgedrückt. Die Röhrchen werden wieder in 1,5 cm Abstand hineingedrückt; aber hier etwas

tiefer als beim Bienenwachs, weil infolge der weicheren Konsistenz des Plastilins beim Brutschrankaufenthalt die Röhrchen sich neigen können oder umfallen können. Der Plastilinständer kann leicht durch einen kapillären Luftschacht zur Gasdiffusion versehen werden. Dazu muß das Mikroröhrchen über ein trichterförmig eingestanztes Plastilinloch aufgestellt werden, das von seitlich her mit einer dünnen Injektionskanüle durchstoßen wird.

Ganzmetallständer aus Messing:

Länge 11 cm, Breite 0,8 cm und Höhe 0,6 cm. Im Abstand von 1,5 cm werden 4 bis 5 mm tiefe Standlöcher eingebohrt. Die Löcher dürfen nicht zu weit sein, damit die Röhrchen nicht herausrutschen, wenn der Ständer zur Prüfung der Rollbewegung der Perlen gekantet wird.

Objektträgerständer mit offenen Mikroröhrchen:

Bei Beobachtung des unverschlossenen Kulturröhrchens in der feuchten Kammer wird als Ständer ein Objektträger verwendet, auf dem die Kulturröhrchen senkrecht zur Längsachse liegen und mit einem Leukoplaststreifen befestigt werden, der in der Mitte



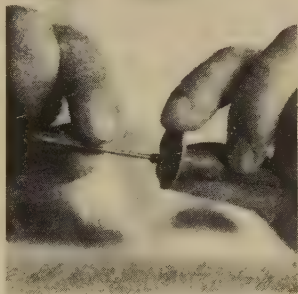
zusätzlich durch eine Büroklammer auf dem Objektträger fixiert wird. Derartige Ständer fassen 8 Röhrchen. Der Objektträger wird in eine Halterung eingehängt, damit

die Kulturröhrchen senkrecht stehen. Für kleinere Versuche eignet sich eine Färbekuvette recht gut, weil sie gleichzeitig als Aufhängevorrichtung und als feuchte Kammer verwandt werden kann. In ihr können bis zu 24 Mikroröhrchen bebrütet werden. Für umfangreiche Versuche wird eine Kunststoffbüchse benutzt; die Objektträger stehen hier in U-förmig gebogenen 2 cm hohen Blechstreifen, die im 2-cm-Abstand parallele Ausschnitte zum Einsetzen der Objektträger haben.

b) Reinigung

Zuerst Abtötung der Kulturen im Autoklaven. Mikroröhrchen befinden sich dabei in einem Erlmeyer-Kolben; das Wasser im Kolben steht etwa 2 cm über der Röhrchenschicht.

Nach Abtötung Ausspülen der Röhrchen mittels Spülkanüle; sie besteht aus einer Flügelkanüle mit einer 1,5 mm starken abgeschliffenen Nadel. Die Kanüle wird durch Gummischlauch an die Wasserleitung angeschlossen. Beim Spülen werden die Röhrchen der ganzen



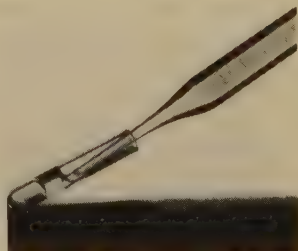
Länge nach auf die Kanüle geschoben und vom Röhrchenboden her ausgespült. Festgeklemmte Glasperlen bei laufendem Wasserstrahl mit der Kanüle losdrücken, Perle bis auf den Röhrchenboden vorschieben und dann das Röhrchen von der Kanüle herunterziehen. Nicht festgeklemmte

Perlen können auch noch durch Ausstauchen entfernt werden. Festsitzende Farb- oder Nährbodenrückstände entweder durch Auswischen mit einem Watteträger oder unter Zusatz von gleichen Teilen konzentrierter Salpetersäure und durch kurzes Aufkochen entfernen. Zur Entfernung der Säure erst den Kolben mit Wasser ausspülen, dann Mikroröhrchen mit der Spülkanüle ausspritzen und Wasserrückstände ausstauchen oder austrocknen lassen.

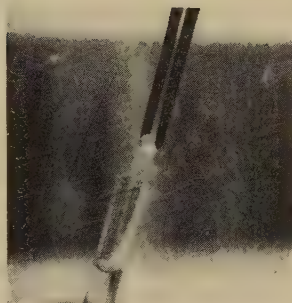
c) Nährbodenbeschickung

Mikroröhrchen mit anatomischer Pinzette aus der Petrischale nehmen und zwischen Daumen und Zeigefinger der freien Hand in Schräglage mit Mundstück nach oben fixieren. Beim Beschicken zuerst Pipettenspitze oder Kanülenspitze der 2,0-Rekord-Spritze auf dem Boden des Mikroröhrchens aufsetzen, dann langsam Substrat einlaufen lassen.

Nicht bis zum Boden eingeführte Pipettenspitzen bedingen, daß Luftblasen in der Substratanordnung entstehen, die durch eine glühende Öse oder durch Erhitzen im Dampftopf zerstört werden können.



Danach Einlegen einer Glasperle mittels Pinzette, bei Gelatine-, Milch- und Plasmasubstraten zusätzlich, und zwar zuerst eine kleine Perle einlegen. Feste Substrate stets ohne Perle.



Beschickung mit festen Substraten: Hierbei Gefahr der Verstopfung durch vorzeitige Erstarrung des Substrates. Deshalb Pipetten in der Flamme vorwärmen und relativ heißen Agar - nicht unter 60°C - aufziehen. Günstig sind für den Anfänger 5,0-Pipetten mit relativ kurzer und weitkalibriger Spitze, die gerade auf den Boden des Röhrchens reicht. Zwischendurch evtl. Spitze durch Flamme ziehen. Verstopfende Koagula durch Aufziehen von kochendem Wasser entfernen. Durch fehlerhafte Beschickung entstandene Luftblasen können nur durch nachträgliche Verflüssigung im Dampftopf entfernt werden.

d) Lagerung

Beschickte Mikroröhrchen werden für die sofortige Beimpfung serienweise nach Nährbodenart sortiert und in kleine Petrischalen gelegt. Für längere Lagerungen oder für Nacherhitzung im Dampftopf werden sie etagenweise mit der Öffnung nach oben in Stuhlröhrchen oder in

Reagenzröhrchen aufbewahrt, die durch Gummistopfen und Leukoplast verschlossen werden. Unten in das Reagenzglas werden eine 3 cm hohe und zwischen die Etagen 0,5 cm dicke Watteschichten gelegt. Einlage und Entnahme der Mikroröhrchen mit Kniepinzette bei Röhrchen und mit anatomischer Pinzette bei Petrischalen.

e) Beimpfung der Nährböden

Zuerst eine 48stündige Sterilitätsprüfung bei 37°C. Haltung der Mikroröhrchen zwischen Daumen und Zeigefinger schräg aufwärts zeigend. Flüssige Substrate mit der Öse und feste Substrate mit der Nadel beimpfen. Danach mit Sparflamme die ganze Circumferenz des Mundstückes abflammen und dabei das Röhrchen zwischen den beiden Haltefingern rollen. Hierdurch wird der Flüssigkeitsfilm verdampft, der die Innenwand des lufthaltigen Röhrchenteiles benetzt und der beim Bestehenbleiben die Stabilität der Kultur gefährdet, weil die Flüssigkeit durch ihn herabfließt. Dann Mundstück nach unten schwenken, warten bis die Perle in die Fixationslage gerollt ist, dann Mikroröhrchen in den Ständer setzen.

2. Vorversuche

a) Untersuchungen zur Frage der Austrocknung.

Die in der Literatur besprochenen Kulturverfahren zeigen, daß die Austrocknung eine große Gefahr für die Lebensfähigkeit der Bakterien darstellt. Einen besonders schädlichen Einfluß übt sie auf die Kulturen aus, die wie die Tbc-Kulturen eine ausgesprochene Vorliebe für feuchte Substrate zeigen und außerdem wochenlang im Brutschrank beobachtet werden müssen. Dieselbe Bedeutung hat sie auch für alle Kulturen, die nur wenige Tage lang mit geringen Substratmengen gezüchtet werden, wie es bei den Mikromethoden der Fall ist; dagegen kann die Austrocknung bei mehrtägigen Kulturen, bei denen mehrere Milliliter Substrat verwendet werden, vernachlässigt werden. Welches Problem die Austrocknung, die durch Abdampfen von Flüssigkeit aus dem Substrat entsteht, für die Mikromethoden im Gegensatz zu den Makroverfahren aufwirft, soll durch folgende Überlegungen deutlich gemacht werden: Wenn beispielsweise in beiden Methoden je 0,1 ml abdampft, so wird bei der Mikromethode die Ausgangssubstratmenge von 0,2 ml um 50 % konzentriert, wodurch eine 0,5%ige Zuckerlösung auf 1% erhöht wird, während die gleiche Zuckerkonzentration bei dem Makroverfahren, das mit 2,0 ml Substrat beschickt ist, nur auf 0,525% steigt.

In der folgenden Tabelle 1 sind die praktisch ermittelten Austrocknungswerte einer 0,5%igen Glukoselösung und die dadurch bedingten täglichen Konzentrationsverschiebungen zusammengestellt. In den Versuchen wurden je 2,0 ml Substrat in ein Reagenzglas und in ein Röhrchen und 0,1 ml Substrat in ein Mikroröhrchen instilliert. Alle Gefäße wurden durch einen Wattestopfen verschlossen und senkrecht bei 37°C aufgestellt. Die täglichen Gewichtsverluste wurden mit einer Mettler-Präzisionswaage ermittelt.

Tab. 1: Tägliche Veränderungen der Konzentration einer 0,5% Zuckerlösung verschiedener Substratmengen infolge Austrocknung

Tage	Reagenzglas mit 2,0 ml		Röhrchen mit 2,0 ml		Mikroröhrchen mit 0,1 ml	
	Verlust in ml	Konzentr. in %	Verlust in ml	Konzentr. in %	Verlust in ml	Konzentr. in %
0	0	0,5	0	0,5	0	0,5
1	0,131	0,535	0,075	0,519	0,040	0,833
2	0,079	0,559	0,041	0,531	0,033	1,851
3	0,065	0,58	0,028	0,539	0,022	10,00
4	0,085	0,61	0,034	0,549	ausgetrocknet	

Aus Tab. 1 ist zu entnehmen, daß kleine Substratmengen von 0,1 ml, wie sie in den Mikroröhrchen enthalten sind, ihre Konzentration von Tag zu Tag besonders stark verändern, während die 2,0 ml großen Substratmengen im Reagenzglas und im Röhrchen in dem selben Zeitraum

erheblich geringere Konzentrationsverschiebungen aufweisen.

Konzentrationsverschiebung an sich entsteht durch Abdampfen von Substratwasser in die Wasseraufnahmefähige, trockene Luft des Brutschrankes. Die relativ geringen Differenzen der Konzentration zwischen dem Reagenzglas und dem Röhrchen einerseits und die großen Unterschiede der Konzentration zwischen dem Reagenzglas, dem Röhrchen und Mikroröhrchen andererseits sind einmal durch die unterschiedliche Größe der Oberflächen der Substrate bedingt, die durch die Kaliberfläche der Kulturgefäße bestimmt wird und die beim Reagenzglas 154 mm^2 , beim Röhrchen 60 mm^2 und beim Mikroröhrchen 7 mm^2 messen; zum zweiten wirkt sich auch noch die Länge des lufthaltigen Kulturgefäßsteiles, die beim Reagenzglas $14,3 \text{ cm}$, beim Röhrchen $11,5 \text{ cm}$ und beim Mikroröhrchen $1,0 \text{ cm}$ beträgt, aus. Es zeigt sich, daß mit Abnahme der überstehenden Luftsäule die Austrocknung ansteigt, denn sie beträgt beim Reagenzglas $0,0005 \text{ ml/mm}^2$ der Kaliberfläche, beim Röhrchen $0,0006 \text{ ml/mm}^2$ und beim Mikroröhrchen $0,005 \text{ ml/mm}^2$. Diese Werte sind für die Austrocknungsverluste des zweiten Tages berechnet. Die Werte des zweiten Tages wurden für die Berechnung der Austrocknung deshalb benutzt, weil sie in der Größenordnung der Werte des dritten und vierten Tages liegen und eine genauere Angabe über die Austrocknung zeigen, als die Werte des ersten Tages, bei denen die Austrocknung größer ist, weil die Röhrchenwände von der Beschickung her mit

Flüssigkeit benetzt sind, die innerhalb des ersten Tages abtrocknet.

Wenn die Höhe der Luftsäule die Austrocknung nicht beeinflussen würde, dann müßten die Austrocknungswerte pro mm^2 des Kaliberquerschnittes für alle 3 Kulturgefäßarten annähernd gleich groß sein, weil die übrigen Faktoren, das sind Substratzusammensetzung, Feuchtigkeitsgehalt der Brutschrankluft, beim Öffnen des Schrankes entstehende Luftströmungen, Beobachtungstemperatur von 37°C und der Temperaturwechsel beim Herausnehmen zum Wiegen, für alle Gefäße äquivalent sind.

b) Untersuchungen zur Frage der aufstellung der Mikroröhrchen.

Hier sollen die Einflüsse der Röhrchenständer auf die Austrocknungsverluste der Mikroröhrchen untersucht werden. Dazu werden alle Mikroröhrchen mit 0,1 ml Leitungswasser beschickt und bis zu max. 20 Tagen bei 37°C im Brutschrank beobachtet, in dem eine Wasserschale aufgestellt ist, die den durch häufiges Öffnen entstehenden Feuchtigkeitsverlust ausgleichen soll. Die Austrocknungsverluste werden mit Ausnahme der feuchten Kammer durch tägliche Wiegekontrollen der Röhrchen mit einer Mettler-Präzisionswaage bestimmt; da die täglichen Verluste innerhalb der 20tägigen Beobachtungszeit um einen für jeden Ständer eigenen Mittelwert pendeln, ist es möglich, einen prozentualen mittleren täglichen Austrocknungsverlust festzulegen. Dadurch wird ein

Vergleichswert geschaffen, durch dessen Größe ein Urteil über die Brauchbarkeit des Ständers an sich, wie über seine spezielle Verwendung abgegeben werden kann; letztere bezieht sich auf die Fragen einer kurzen oder langen Beobachtungszeit und auf die Aufstellung außerhalb oder in einer feuchten Kammer. Die Röhrchen in der feuchten Kammer werden nur nach dem zehnten und zwanzigsten Tag gewogen, um eine zusätzliche Austrocknung durch häufiges Öffnen der Kammer zu vermeiden; aus diesen Werten wird dann ebenfalls ein prozentualer mittlerer täglicher Austrocknungsverlust errechnet, um einen Vergleichswert zu den Austrocknungsverlusten der Röhrchen, die außerhalb der feuchten Kammer beobachtet werden, zu erhalten.

Als feuchte Kammer werden eine Objektträgercuvette und eine Plastikbüchse verwendet, deren Deckelfugen mit Leukoplast überklebt werden, um die Austrocknung zu verringern.

Tab. 2 zeigt Austrocknungsverluste der Mikroröhrchen, die mit 0,1 ml Leitungswasser beschickt und in verschiedenen Ständern beobachtet wurden.

Lfd. Nr.	Modell des Ständers	Wasserverlust in ml in Tagen		tgl. Wasserverlust in ml	mittlerer täglicher Verlust in %
1.	Röhrchen ohne Verschuß	0,1	3 Tage	0,023 - 0,040	33,3
2.	Röhrchen mit Wattestopfen	0,1	3 Tage	0,022 - 0,039	33,3
3.	Bienenwachs	0,019	20 Tage	0 - 0,002	0,95
4.	Plastilin	0,012	20 Tage	0 - 0,001	0,6
5.	Metall-(Holz-)Leukoplast	0,031	20 Tage	0,001 - 0,004	1,55
6.	Messing	0,1	7 Tage	0,012 - 0,015	14,3
7.	Plastilin mit Luftschaft	0,1	8 Tage	0,01 - 0,013	12,5
8.	feuchte Kammer mit offenem Röhrchen	0,009	10 Tage	nicht gemessen	0,65
		0,013	20 Tage		
9.	feuchte Kammer mit Röhrchen im Messingständer	0,002	10 Tage	nicht gemessen	0,2
		0,004	20 Tage		

Aus Tabelle 2 ist zu entnehmen, daß offene (Nr. 1) oder durch Wattestopfen (Nr. 2) verschlossene Mikroröhrchen selbst für eintägige Beobachtungszeiten nicht verwendet werden können, weil die tägliche Austrocknung zu groß ist; sie führt dazu, daß flüssige Substratmen- gen von 0,1 ml spätestens nach dem dritten Beobachtungs- tag ausgetrocknet sind. Der Ständer aus Bienenwachs (Nr. 3) ist infolge seiner relativ geringen Austrocknung die täglich etwa 1 % der Substratmenge beträgt, für eine mindestens 10tägige Beobachtungszeit sehr gut außerhalb der feuchten Kammer geeignet. Dieser Ständer zeichnet sich außerdem durch das billige Material und durch die leichte Art seiner Herstellung aus. Das Wachs ist durch Erhitzen sterilisierbar, und vor dem Aufstel- len der Mikroröhrchen kann die Oberfläche noch einmal mit der Sparflamme des Bunsenbrenners sterilisiert wer- den, wobei das Wachs ohne Nachteile in einer dünnen Schicht zum Schmelzen gebracht werden kann.

Durch den Plastilinständer (Nr. 4) ist ein optimaler Austrocknungsschutz gesichert. Der Ständer ist daher ge- eignet für Langzeitkulturen, die außerhalb der feuchten Kammer beobachtet werden, und die auf eine Gasdiffusion zwecks Zuführung von Sauerstoff nicht angewiesen sind. Die Oberfläche kann ebenfalls mit der Sparflamme vor dem Aufstellen der Mikroröhrchen sterilisiert werden.

Der Leukoplastständer mit Holz- oder Metallrahmen (Nr.5) leistet bezüglich des Austrocknungsschutzes etwa gleiches

wie der Bienenwachsständer. Er bietet einige arbeitstechnische Vorteile, die in einer bequemeren Aufstellung der Röhrchen, in einem sicheren Transport und in einem guten Überblick bestehen. Wirtschaftlich stellt er sich teurer als der Bienenwachsständer, weil das Leukoplast, das in gespanntem Dampf bei 125°C bis zu 30 Minuten erhitzt werden kann, nur einmal verwendet wird, während das Bienenwachs mehrmals benutzt wird.

Der Messingständer (Nr.6 und 9) eignet sich für eintägige Kulturen außerhalb der feuchten Kammer und in Verbindung mit der feuchten Kammer für Langzeitkulturen. Bei ihm ist eine Gasdiffusion möglich. Er kann als solcher sterilisiert werden oder die Standlöcher können einzeln mit der Sparflamme ausgeflammt werden. Wenn von den einmalig relativ teuren Anschaffungskosten abgesehen wird, dann vereinigt er in sich die günstigsten Eigenschaften eines Ständers für die Mikroröhrchen, weil er sowohl für kurzfristige Beobachtungszeiten außerhalb der feuchten Kammer, als auch für langfristige Kulturen in Verbindung mit der feuchten Kammer eingesetzt werden kann.

Das Ständermodell Nr. 8 , bei dem offene Mikroröhrchen verwendet werden, kann nur innerhalb der feuchten Kammer aufgestellt werden, da die Austrocknungsverluste sonst bereits nach einem Tag zu groß sind. Bezüglich der Gasdiffusion bestehen hier optimale Verhältnisse. Das billige

Material, die leichte Anfertigung, das schnelle Sterilisieren mit der Sparflamme, wie die einfache Materialentnahme und Zugabe von Reagenzien zeichnen diesen Ständer aus.

Mit dem Plastilinständer Nr. 7 sollte der Versuch unternommen werden festzustellen, ob eine Beobachtung von Langzeitkulturen außerhalb der feuchten Kammer durchgeführt werden könnte. Die Austrocknung der Mikroröhrchen innerhalb von acht Tagen zeigt aber, daß die in diesen Ständer gesetzten Erwartungen nicht erfüllt wurden. Deshalb findet dieser Ständer keine weitere Verwendung, weil er außerhalb der feuchten Kammer durch den Messingständer und in Verbindung mit der feuchten Kammer ebenfalls durch den Messingständer oder durch den Objektträgerständer mit offenen Röhrchen ersetzt werden kann.

3. Leistungsfähigkeit der Einsparmethode in der Bunten Reihe.

a) Methodik.

Die Leistungsfähigkeit der Einsparmethode wird in Parallelversuchen mit der üblichen Bunten Reihe (31) getestet. Zur Einsaat werden serologisch oder biochemisch analysierte Stämme der Familien der Enterobacteriaceae und Pseudomonadaceae aus der Stammsammlung des Institutes für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie der Freien Universität verwendet, die in 1-2wöchigen Abständen auf Endoplaten überimpft und bei $+4^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt werden. Die Nährböden beider Methoden werden teils bei $+4^{\circ}\text{C}$ im Kühlschrank, teils bei Zimmertemperatur gelagert, nachdem sie nach ihrer Abfüllung 30 Minuten lang im strömenden Dampf sterilisiert worden sind. Vor der Impfung werden sie zwecks Prüfung der Sterilität 24 Stunden bei 37°C bebrütet. Insgesamt werden 24 Stämme, und mit jedem Stamm 27 verschiedene Nährböden getestet.

Stämme:

S. paratyphi A, *S. paratyphi* B Lysotyp 1, *S. java*, *S. typhi* Typ A, *S. meleagridis*, *S. worthington*, *Escherichia coli*, *Dyspepsie coli* O 25, *Dyspepsie coli* O 26, *Dyspepsie coli* O 55, *Dyspepsie coli* O 86, *Dyspepsie coli* O 111, Ballerup 1076, *Citrobacter* Ci 4, *Cloaca cloacae*, *Serratia marescens*, *Hafnia* XXVI/5, *Proteus* OX 2, *Proteus* OX 19, *Proteus* HX 19, *Proteus mirabilis*, *Proteus morganii*, *Proteus rettgeri* und *Pseudomonas aeruginosa* (*s. pyocaneus*).

Nährböden (19,27, 31):

Trypsin-Bouillon, Gelatinenährboden in hoher Schicht, Eisenagar nach Kligler zur Feststellung der H_2S -Bildung, Ammonium-Citrat- und Ammonium-Glucose-Agar, Substrat für Voges-Proskauer-Reaktion, Harnstoff-Peptonlösung nach W.Blake-Christensen, Harnstoff-Dextrose-Agar modifiziert nach H.Preuss, Substrat zur Nitrat-Reduktion, flüssige Substrate mit Glucose-, Lactose-, Saccharose-, Mannit-, Adonit-, Dulcit-, Sorbit-, Arabinose-, Xylose-, Rhamnose-, Maltose-, Salicin-, Inosit- und Mucat-Zusätzen; d-Tartrat, i-Tartrat und l-Tartrat in flüssigem Nährsubstrat und Ammon-Agar mit Natrium-Citrat.

Alle flüssigen Nährböden und die Schrägagarsubstrate der üblichen Bunten Reihe werden mit der Öse und die festen Substrate der Einsparmethode werden mit der Nadel geimpft. Die Beimpfung erfolgt mit einer 5-8stündigen, bei $37^{\circ}C$ bebrüteten Bouillonkultur, die von einer Einzelkolonie einer Endoplatte ausgehend beimpft worden ist. Anschließend erfolgt Bebrütung bei $37^{\circ}C$. Indol-Bildung, Voges-Proskauer-Reaktion, Nitrat-Reduktion und die Reaktionen der Substrate mit Weinsäurezusätzen werden nach einem Tage geprüft, und die anderen Nährböden werden bis zu 10 Tagen bei $37^{\circ}C$ beobachtet. Bei den flüssigen Substraten mit Glucose-, Lactose- und Saccharose-Zusätzen werden Säure- und Gasbildung nach 24 Stunden beurteilt.

b) Ergebnisse.

Die Kulturergebnisse sind in Tabelle 3 zusammengefaßt.

Tab. 3

Biochemisches Verhalten einiger gramnegativer Bakterien bei versch

Test-Substrat	Teststämme																
	S. para-typhi A	S. paratyphi B Typ 1	S. java	S. typhi Typ A	S. melleagridis	S. worthington	E. coli	Dyspepsie coli 0 25	Dyspepsie coli 0 26	Dyspepsie coli 0 55	Dyspepsie coli 0 86	Dyspepsie coli 0 111	Ballerup 1076	Citrobacter C1 4	Cloaca cloacae	Serratia marcescens	Hanania
Indol	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Gelatine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
H ₂ S	-	$\begin{smallmatrix} +2 \\ 5 \end{smallmatrix}$	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	$\begin{smallmatrix} +2 \\ 5 \end{smallmatrix}$	-	-	-
Amm.-Citrat	$\begin{smallmatrix} +7 \\ 9 \end{smallmatrix}$	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	$\begin{smallmatrix} +5 \\ 5 \end{smallmatrix}$	$\begin{smallmatrix} +8 \\ 1 \end{smallmatrix}$	$\begin{smallmatrix} +3 \\ 2 \end{smallmatrix}$	$\begin{smallmatrix} +3 \\ 2 \end{smallmatrix}$
Amm.-Glucose	$\begin{smallmatrix} +3 \\ 2 \end{smallmatrix}$	+	+	-	+	+	+	+	+	$\begin{smallmatrix} +2 \\ 2 \end{smallmatrix}$	+	+	+	$\begin{smallmatrix} +3 \\ 1 \end{smallmatrix}$	$\begin{smallmatrix} +2 \\ 2 \end{smallmatrix}$	$\begin{smallmatrix} +2 \\ 1 \end{smallmatrix}$	$\begin{smallmatrix} +2 \\ 1 \end{smallmatrix}$
Vog.-Prosk.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Harnstoff flüssig	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Harnstoff fest	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Nitrat	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	$\begin{smallmatrix} +6 \\ 1 \end{smallmatrix}$	+	+
Glucose	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Lactose	-	-	-	-	-	-	++	++	++	++	++	++	++	++	-	-	-
Saccharose	-	-	-	-	-	-	-	++	++	++	-	++	-	-	-	++	++
Mannit	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Adonit	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Dulcit	+	+	+	-	+	$\begin{smallmatrix} +4 \\ 2 \end{smallmatrix}$	$\begin{smallmatrix} +2 \\ 1 \end{smallmatrix}$	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Sorbit	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+
Arabinose	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	$\begin{smallmatrix} +2 \\ 1 \end{smallmatrix}$	-	-
Xylose	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Rhamnose	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	$\begin{smallmatrix} +4 \\ 1 \end{smallmatrix}$	-	-
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	$\begin{smallmatrix} +2 \\ 2 \end{smallmatrix}$	+	+	+
Salicin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Inosit	-	+	$\begin{smallmatrix} +2 \\ 1 \end{smallmatrix}$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
d-Tartrat	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
i-Tartrat	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
l-Tartrat	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Na-Citrat	-	+	+	-	+	$\begin{smallmatrix} +5 \\ 4 \end{smallmatrix}$	-	-	-	-	-	-	+	+	$\begin{smallmatrix} +2 \\ 2 \end{smallmatrix}$	+	+
Mucat	-	+	+	-	+	$\begin{smallmatrix} +4 \\ 1 \end{smallmatrix}$	$\begin{smallmatrix} +2 \\ 1 \end{smallmatrix}$	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-

iedenen Kulturmethode

XXVI/5	Proteus OX 2	Proteus OX 19	Proteus HX 19	Proteus mirabilis	Proteus morganii	Proteus rettingeri	Ps.aero- ginosa
-	+	+	+	-	+	+	-
-	+	+	-	+	-	-	+
-	+1 +5	+	+1 +2	+	-	-	-
-	-	-	+4 +3	+9 +8	-	+5 +3	+
-	+	-	+	+3 +1	-	+6 +3	+
-	-	-	-	-	-	-	-
-	+	+	+	+	+	+	-
-	+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+4 +1	+	-
+-	++	++	++	++	++	+1 -2	-
-	-	-	-	-	-	-	-
+-	++	+-	-	-	-	-	-
+	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	+	-
-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	+	-
-	+	+	+	+	-	+	-
-	-	-	-	-	-	-	-
+	+	+1 +2	-	-	-	-	-
+3 +3	+	+	+	-	-	+	-
-	-	-	-	-	-	+	-
-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-
-	+4 +1	+4 +2	+2 +1	+	-	+2 +2	+
-	-	-	-	-	-	-	-

Zeichenerklärung zu Tab. 3:

- + = übereinstimmend positive Reaktionen nach 24 Stunden.
 $+_2^2, +_3^3$ = übereinstimmend positive Reaktionen nach Tagen;
 die obere Zahl bezieht sich auf die Originalmethode und die untere auf die Einsparmethode.
 $+_3^2$ = nicht übereinstimmend positive Reaktion nach Tagen.
 + + = übereinstimmend Säure- und Gasbildung.
 + - = übereinstimmend Säure- ohne Gasbildung.
 - = übereinstimmend negative Reaktionen bis zu zehntägiger Bebrütung.
 = Markierung eines Feldes mit unterschiedlichen Reaktionen.

Aus Tab. 3 läßt sich Folgendes entnehmen.

Übereinstimmende Reaktionen gibt es bei Trypsin-Bouillon, beim Substrat für Voges-Proskauer-Reaktion, bei den flüssigen Substraten mit Weinsäurezusätzen, bei der Harnstoff-Peptonlösung, beim Harnstoff-Dextrose-Agar und bei den flüssigen Nährsubstraten mit Lactose-, Saccharose-, Mannit-, Adonit-, Sorbit-, Xylose- und Salicin-Zusätzen.

Übereinstimmend sind alle Reaktionen hinsichtlich Verflüssigung bzw. Nichtverflüssigung von Gelatine. Zeitliche Differenzen werden bei den fünf verflüssigten Kulturen nicht beobachtet.

Sowohl die Säure- als auch die Gasbildung aus Glucose, Lactose und Saccharose stimmen bei der Einsparmethode mit dem Originalverfahren überein.

Bei einigen positiven Reaktionen werden Zeitdifferenzen zwischen den Methoden beobachtet; der Ausfall der Reaktionen gleicht sich aber in allen Fällen innerhalb der Beobachtungszeit, d.h. in 10 Tagen aus, so daß sie am Ende dieser Zeit übereinstimmend positiv sind. Als Standard dienen die Reaktionen der Originalmethode. Die Reaktionen der Einsparmethode werden auf sie als "vorzeitige", das sind früher auftretende und "nachzeitige" d.h. später auftretende bezogen.

"Vorzeitige" Reaktionen der Einsparmethode zeigen sich bei folgenden Substraten: Beim Substrat zur Nitrat-Reduktion je einmal 3 und 5 Tage vor der Originalmethode, beim flüssigen Substrat mit Dulcitol-Zusatz je einmal 1 und 2 Tage, beim Substrat mit Arabinose-Zusatz einmal 1 Tag, beim Substrat mit Rhamnose-Zusatz einmal 3 Tage, beim Substrat mit Inositol-Zusatz einmal 1 Tag, beim Substrat mit Mucatin-Zusatz zweimal 1 Tag, beim Ammonium-Citrat-Agar dreimal 1 und je einmal 2 und 7 Tage, beim Ammonium-Glucose-Agar je zweimal 1 und 2 und einmal 3 Tage und beim Ammon-Agar mit Natrium-Citrat zweimal 1 und je einmal 2 und 3 Tage.

"Nachzeitige" Reaktionen werden beobachtet bei der H_2S -Bildung einmal 1 und zweimal 3 und einmal 4 Tage, beim Ammonium-Citrat-Agar einmal 2 Tage und bei den Substraten mit Glucose- und Maltose-Zusätzen je einmal 1 Tag.

4. Wertigkeit der Methoden.

Anhand der ermittelten Ergebnisse soll die Gleichwertigkeit, Überlegenheit oder Unterlegenheit der Einsparmethode gegenüber dem Originalverfahren diskutiert werden.

Die Untersuchungen zeigen, daß grundsätzlich alle getesteten

Substrate - ausgenommen das Substrat für KCN-Test - bei der Einsparmethode Verwendung finden können.

Gleichwertig erscheint die Einsparmethode bei folgendem Substraten: Trypsin-Bouillon, Substrat für Voges-Proskauer-Reaktion und flüssiges Nährsubstrat mit den Salzen der Weinsäure. Beim Substrat für Nitrat-Reduktion zeigt die Einsparmethode in zwei Fällen sogar vorzeitige Reaktionen an; diese positiven Reaktionen wären bei der einmaligen Testung der üblichen Bunten Reihe verloren gegangen, wenn nicht durch wiederholte tägliche Testung in den folgenden Tagen (35) die Verzögerung doch noch festgestellt worden wäre.

Bei der Gelatineverflüssigung ist die Einsparmethode gleichwertig. Mittels der sinkenden Glasperle ist die Verflüssigung leicht nachweisbar; allerdings muß bei solch kleinen Röhrchen, wie sie bei der Einsparmethode Verwendung finden, stets eine Glasperle benutzt werden, weil sonst die Verflüssigung nicht erkennbar ist. Auch eine Beurteilung von bei 37°C bebrüteten Gelatineröhrchen ist möglich, wenn die Röhrchen vor der Ablesung für einige Zeit im Kühlschrank gehalten wurden. Die Beweglichkeit oder Unbeweglichkeit der Glasperle zeigt auch hier Verflüssigung bzw. Nichtverflüssigung an.

Bei 4 flüssigen Substraten mit Zuckerzusätzen und beim Substrat mit Mucat-Zusatz zeigt die Einsparmethode 7 vorzeitige Reaktionen, während sie bei 2 Substraten mit Zuckerzusätzen je 1 nachzeitige Reaktion aufweist. Die Frage nach dem Leistungsgrad der Einsparmethode kann trotz ihres zahlenmäßig ausdrückbaren Vorsprunges nur im Sinne einer Gleichwertigkeit beantwortet werden, weil die Vorsprünge relativ gering sind, selten auftreten und noch im üblichen Streuungsbereich gleich-

artiger Subkulturen liegen, deren Wachstum und biochemischer Charakter sich unterschiedlich ausbilden.

Hinsichtlich der quantitativen Gasbildung besteht Gleichwertigkeit. Die Größe des Gasvolumens schwankt zwischen Stecknadelkopfgröße und einem Drittel des Röhrchenvolumens.

Bei den festen Substraten sind unterschiedliche Reaktionen zwischen beiden Methoden aufgetreten. Bei der Prüfung der H_2S -Bildung läßt die Einsparmethode eine eindeutige Unterlegenheit erkennen, weil sie 4 nachzeitige von insgesamt 9 positiven Reaktionen aufweist. Die durchschnittliche Verzögerung ist mit 2,7 Tagen im Routineverfahren groß, wenn kurzfristig Ergebnisse gewünscht werden. Kommt es auf rasche Ergebnisse an, ist die Mikromethode für diesen Nährboden abzulehnen.

Bei Amm.-Citrat treten 5 vorzeitige und 1 nachzeitige, bei Amm.-Glucose 5 vorzeitige und bei Na-Citrat 4 vorzeitige Reaktionen auf.

Bei dem flüssigen und festen Harnstoffsubstrat stimmen alle Reaktionen überein, so daß eine Gleichwertigkeit der Einsparmethode gegeben ist.

Die Gleichwertigkeit der mit der Einsparmethode erzielten Reaktionen - die Prüfung der H_2S -Bildung einmal ausgenommen - war auf Grund der unterschiedlichen technischen Voraussetzungen nicht von vornherein zu erwarten; es zeigte sich, daß die Unterschiede zwischen dem Verhältnis der Einsaat zum Nährboden, zwischen den Substratvolumina mit ihren Diffusionsmöglichkeiten von Stoffwechselprodukten, zwischen der für die Gasdiffusion geeigneten Oberfläche und zwischen

dem Verhältnis der Berührungsflächen von Glaswand und Substrat keine nachteiligen Einflüsse auf das Ergebnis der Einsparmethode ausübten.

Aus praktischer Erfahrung und theoretischer Sicht können die aufgeführten Faktoren die Stoffwechselleistungen der Kulturen beeinflussen. Ein Teil der vorzeitigen Reaktionen wird durch die Größe der Einsaat bedingt sein, was S e i d e l (57) bereits bei seiner Mikromethode ausgeführt hat, und was hier die Zeitdifferenzen bei der Nitratreduktion bestätigen; es zeigt sich, daß bei anfänglich gleicher Einsaat von 1 Öse *Cloaca cloacae* die um 5 Tage verzögert auftretende positive Reaktion der üblichen Bunten Reihe durch Erhöhung auf 0,1 ml Einsaat ausgeglichen werden kann. Doch die Größe der Einsaat allein kann es, wie P e t r u s c h k y (49) bereits 1889 nachgewiesen hat, nicht sein, denn sonst dürfen nachzeitige Reaktionen bei der Einsparmethode nicht vorkommen, was auch durch die Versuche bestätigt wird. Sicherlich liegt hier ein komplexes Geschehen vor, zu dem durchaus Bioauxine (52) gehören können, die bei der raschen Vermehrung von *Leptospiren*-stämmen, deren Einsaat über einem bestimmten Minimum liegen muß, als Ursache angesehen werden. Alle bei der Einsparmethode auftretenden vorzeitigen und nachzeitigen Reaktionen, nach Tagen abgelesen, sind in Tabelle 4 zusammengestellt. Jedes Substrat wurde mit 24 Stämmen getestet, und die Summe seiner positiven Reaktionen wie die zeitgerechten und die nicht zeitgerechten Reaktionen, letztere unterteilt in vorzeitige und nachzeitige, werden in besonderen Spalten aufgeführt. Zeitgerecht sind alle Reaktionen der Einsparmethode, die mit der üblichen Bunten Reihe übereinstimmen.

Tabelle 4

Zusammenstellung aller vor- und nachzeitigen Reaktionen der Einsparmethode.

Substrate	Differenzen nach Zahl der Tage							alle pos. Reaktionen	zeitgerecht	vor-zeitig	
	I	II	III	IV	V	VI	VII			vor-	nach-
H ₂ S	-1		-2	-1				9	5	0	4
Amm.-Citrat	+3	+1					+1	13	7	5	1
Amm.-Glucose	+2	+2	+1					20	15	5	0
Nitrat				+1		+1		23	21	2	0
Glucose	-1							23	22	0	1
Dulcit	+1	+1						13	11	2	0
Arabinose	+1							15	14	1	0
Rhamnose			+1					13	12	1	0
Maltose	-1							18	17	0	1
Inosit	+1							3	2	1	0
Na-Citrat	+2	+1	+1					14	10	4	0
Mucat	+2							9	7	2	0
Summe	+12 - 3	+5 - 1	+3 - 2	+1 - 1		+1	+1	173	143	23	7

Erläuterung: + = vorzeitige Reaktion } bezogen auf Originalmethode
 - = nachzeitige Reaktion }

Das kleinere Kulturvolumen bei der Einsparmethode könnte sich ebenfalls auf den Stoffwechsel auswirken, wodurch das oftmals schnellere Zurückschlagen des Bromthymolblauindikators erklärt werden kann.

Das bei der Einsparmethode relativ große Verhältnis der Glaswand zum Nährmedium kann sich durch Diffusion von Erdalkalitionen von der Glasfläche stärker auf den pH auswirken und damit auf das Wachstum der Kultur.

Zur endgültigen Klärung müßten die theoretischen Möglichkeiten experimentell bestätigt werden, was jedoch den Rahmen der Arbeit überschreitet, die eine empirische Bestätigung der Brauchbarkeit der Einsparmethode liefern soll.

Bei der Beurteilung der Leistungsfähigkeit einer Methode muß beachtet werden, daß neue Methoden in den Händen ihrer Autoren häufig bessere Resultate liefern als in den Händen derer, die diese Methoden nacharbeiten. Wie überall erfordert auch die Einsparmethode eine gewisse Einarbeitungszeit, um das Manipulieren mit den Röhrchen flüssig zu erlernen. Das Halten der Röhrchen mit der Pinzette, ihre Beschickung mit der Spritze oder Pipette und das Einlegen der Glasperle erfordern jedoch keine größere Geschicklichkeit und Konzentration als die von Seiffert (58), Knorr (34), Wesselinoff (69) und Seidel (57) entwickelten Mikromethoden oder als das Füllen von Präzipitierröhrchen.

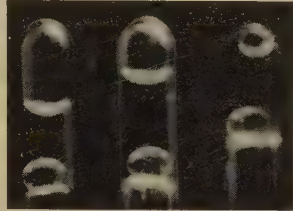
Bei der Einsparmethode ist gegenüber den anderen Mikromethoden, die Röhrchen verwenden (34,57,69) und mit flüssigen

Substraten arbeiten, ein einfach und zuverlässig arbeitendes Beschickungsverfahren auch für feste Umschlagssubstrate ausprobiert worden; die relativ häufigen Frühreaktionen dieser festen Substrate (vergleiche Tab. 4) lassen diesen bisher für Mikromethoden ausgesparten Verwendungsbereich als möglich und empfehlenswert erscheinen, weil in ungünstigen Arbeitssituationen, das sind Notzeiten, auch für feste Substrate die Eigenschaften der Einsparmethode ausgenutzt werden können.

Besonders bewährt aber hat sich die Verwendung einer Glasperle bei der Beurteilung der Gelatineverflüssigung und der Milch- und Plasmakoagulation. Während bei den zitierten Mikromethoden die Veränderung der vorgenannten Substrate wohl aus prinzipiellen Schwierigkeiten nicht besonders erwähnt wurde, konnte mit der Glasperle ein Ergebnis einwandfrei beurteilt werden, nämlich dann, wenn die Perle beim Drehen der Röhrchen ihre ursprüngliche Lage verändert oder beibehalten hatte. Jedoch fehlen hier für Milch- und Plasmaböden urteilsfähige Vergleichsreihen mit den Originalmethoden. Durch Einzelversuche mit Methylenblau- und Lackmusmilch, wie sie u.a. zur Differenzierung von *Sc. agalactiae* und *Sc. lactis* (56) und zur Prüfung von Staphylokokken auf Plasmakoagulasebildung (53) herangezogen werden, konnte lediglich die grundsätzliche Anwendbarkeit der Einsparmethode demonstriert werden. Es ist durchaus möglich, daß sich selbst unter normalen Arbeitsbedingungen für die Einsparmethode eine Verwendung ergibt, wenn Plasma von Mäusen,

Ratten, Goldhamster und anderen kleinen Versuchstieren geprüft wird, die normalerweise wenig Plasma liefern.

Durch die umgekehrt aufgestellten Röhrchen, die hier den Durhamröhrchen gleichen, ist in Grenzen bei jedem Röhrchen eine quantitative Aussage über die Gasbildung möglich, weil die einzelnen aufsteigenden Gasbläs-



chen in der Röhrchenkuppe zu einer einheitlichen Gasblase konfluieren, die in der Größe ihres Volumens das Substrat nach unten drückt, ohne dabei die Stabilität der Kultur zu zerstören. Hingegen tritt die Gasbildung bei der Mikromethode von Seiffert und Wesselinoff in Form isolierter Gasbläschen auf, die nicht konfluieren und deshalb auch keine vergleichende Gasschätzung erlauben. Während die Gasbildung bei Wesselinoff analog zur Einsparmethode in jeder Kultur nachweisbar ist, muß bei der Tröpfchenmethode von Seiffert eine zusätzliche flüssige Kultur angelegt werden, da die festen Indikatorsubstrate mit ihren Oberflächenkulturen keine Gasbildung anzeigen.

Ungeeignet erweist sich die Einsparmethode beim KCN-Substrat der Bunten Reihe, weil infolge von Lichtreflexen, die an den relativ stark gekrümmten Röhrchen auftreten, keine Beurteilung der schleierartigen Nährbodentrübung möglich ist

und auch die schon bei der Originalmethode sehr wichtige und schwierige und für den Reaktionsausfall entscheidende Dosierung bei der Einimpfung hier nicht mehr genügend zuverlässig erreicht werden kann.

Auf Grund der vorliegenden Versuche mit Aerobiern hat sich die Einsparmethode nicht für alle Bedingungen als optimal erwiesen. Auf Versuche mit Anaerobiern wurde verzichtet, weil im Prinzip keine anderen Ergebnisse zu erwarten waren. Die erfahrungsgemäß bei Kulturen von Gasbrandclostridien auftretende starke Gasbildung und die allgemein erforderliche Sauerstoffabsorption wären hier zu diskutieren. Durch die starke Gasfüllung könnte bei der Röhrchenlänge von 2,5 cm eine Zerstörung der Kulturen dadurch erfolgen, daß die Ferle mitsamt dem Substrat ausgestoßen wird. Diese Gefahr kann durch eine Verlängerung der Röhrchen auf 4 bis 5 cm beseitigt werden, ohne daß dadurch das physikalische Prinzip der Methode verändert wird. Bei Verwendung eines Sauerstoffabsorbers könnten die Röhrchen in einem Mantelgefäß aufbewahrt werden nach Art abgefüllter Substrate, die in einem Reagenzglas zur längeren Lagerung luftdicht abgeschlossen werden.

Bei kritischer Beurteilung der Einsparmethode hinsichtlich der Verwendung im allgemeinen Laborbetrieb ist die Methode aus Gründen der durch die kleinen Maße bedingten Arbeitsbelastungen, der nicht optimalen Verwendbarkeit der Substrate der Originalmethode und der relativ geringen Kosteneinspa-

rung gegenüber der längeren Arbeitsdauer nicht zu empfehlen bzw. würde sich nicht durchsetzen. Hingegen erlaubt die Einsparmethode die Durchführung umfangreicher Untersuchungen in den Fällen, wo die übliche Bunte Reihe oder die zitierten Mikromethoden nicht mehr voll verwendet werden können. Dies trifft besonders für die Untersuchung von Substraten zu, die nur in geringen Mengen zur Verfügung stehen, z. B. Milch und Serumproben kleiner Säugetiere; auch für wissenschaftliche Arbeiten, z. B. Dissertationen, bei denen durch ausschließliche Verwendung der Mikromethode eine dem Originalverfahren äquivalente Arbeitstechnik entwickelt wird oder für Notzeiten, in denen bei allgemeiner Verknappung der Substrate größere Versuchsreihen erforderlich werden, könnte die hier beschriebene Methode sinnvoll angewendet werden.

III. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird eine Mikromethode (Einsparmethode) zur Anzüchtung von Bakterien bzw. zur Prüfung von Stoffwechselleistungen bei Bakterien erprobt. Diese Untersuchungen erfolgten einmal unter dem Gesichtspunkt der Verwendung dieser Methode als solcher unter allgemeinen und besonderen Bedingungen und unter dem Gesichtspunkt der Einsparung von flüssigen und festen Nährsubstraten. Im vergleichenden Versuch wurden Bunte Reihen einmal auf üblichen Kulturgefäßen und zum anderen auf Mikroröhrchen (Länge 2,5 cm und $\varnothing$ 3 mm) angelegt.

Es zeigte sich, daß die Mikromethode prinzipiell brauchbar ist, da die Reaktionen bei beiden Methoden in großen Zügen übereinstimmten; Abweichungen wurden vor allem in Form zeitlicher Differenzen beim Auftreten von positiven Reaktionen beobachtet, die in der Einsparmethode in mehr als $2/3$ der auftretenden Fälle früher als in der Originalmethode ablesbar waren.

Bestimmte Nährsubstrate konnten in der Mikromethode nicht mit Erfolg angewendet werden (Kligler, KCN-Test).

Kritisch betrachtet ist die Einsparmethode besonders geeignet für die Untersuchung von Substraten, die nur in kleinen Mengen zur Verfügung stehen (z.B. Milch und Serumproben kleiner Säugetiere), weniger geeignet für die allgemeine Anwendung bei Routineuntersuchungen.

D Schrifttum
=====

- 1 B a r t o s c h e w i t s c h, S.: Die feuerfesten Watterpfropfen für die Probiergläser.
Zbl. Bakt. I Orig. 4, 212 (1888)
- 2 B a u d e t, E.: Eine praktische Methode die Virulenz der Bakterien zu erhalten und deren Lebensdauer auf künstlichen Nährböden zu verlängern.
Dtsch. tierärztl. Wschr., 28, 623 (1920)
- 3 C o m m a n d o n, J. et de F o n b r u n e, P.: La chambre a l'huile, ses avantages pour l'étude des micro-organismes vivants, la culture des tissus et la micromanipulation.
Ann. Inst. Pasteur 60, 113 (1938)
- 4 D a h m e n, M.: Die feuchten Kammern.
Zbl. Bakt. I Orig. 12, 460 (1892)
- 5 D a w s o n, Ch. F.: Eine Methode, Dauerkulturen von Bakterien hermetisch zu verschließen.
Zbl. Bakt. I Orig. 12, 720 (1892)
- 6 D i k o m e i t, B.: Verfahren zur Konservierung lebender Bakterien.
Zbl. Bakt. I Orig. 101, 290 (1927)
- 7 D i m i t r i j e w i c - S p e t h, V. und K i t - s c h e v a z, V.: Der anaerobe hängende Tropfen und die anaerobe Mikrokultur.
Zbl. Bakt. I Orig. 119, 141 (1930)
- 8 D o l d, H.: Wasserverschluß der Kulturgefäße zur Verhinderung der Austrocknung des Nährbodens.
Zbl. Bakt. I Orig. 153, 335 (1949)
- 9 D o l d, H. und G i l d e m e i s t e r, E.: Neue Kulturschalen.
Zbl. Bakt. I Orig. 109, 344 (1928)
- 10 v o n D a r a n y i, J.: Beitrag zur Konservierung von Bakterienkulturen mit Paraffin.
Zbl. Bakt. I Orig. 108, 160 (1928)
- 11 E i c h b a u m, F.: Eine einfache Maßnahme zur Verbesserung der Tuberkelbazillenzüchtung auf Eiernährboden.
Zbl. Bakt. I Orig. 128, 302 (1933)
- 12 F r i e d, H.: Technik for sealing bacteriologic mediums.
J. of Amer. med. Ass. 90, 2100 (1928)
- 13 F o r n e t, W.: Ein praktisches Reagenzglas.
Zbl. Bakt. I Orig. 86, 606 (1921)

- 14 F o r t n e r , J. : Die Mikroskopie der aeroben und an-aeroben Oberflächen-Kolonien auf hängendem Agar.
Zbl.Bakt. I Orig. 115, 96 (1929)
- 15 G i e s z c y k i e w i c z , M. : Sur la conservation des souches du Gonocoque.
C. r. Soc. Biol. 98, 388 (1928)
- 16 G l a g e , F. : Ein Metallverschluß für Reagenzgläser.
Zbl. Bakt. I Orig. 33, 479 (1903)
- 17 G o t t s a c k e r , E. : Die Kultur des Erregers der Tuberkulose.
Zbl. Bakt. I Orig. 154, 347 (1949)
- 18 G ü l l b e r g , E. : Eine einfache Massenkulturmethode.
Zbl. Bakt. I Orig. 123, 400 (1932)
- 19 H a l l m a n n , L. : Bakteriologische Nährböden.
G. Thieme, Stuttgart 1953
- 20 H e l l y , K. : Verschlußringe für Fernet'sche Kultur-röhrchen.
Zbl. Bakt. I Orig. 132, 248 (1934)
- 21 H e n n e b e r g , W. : Handbuch der Gärungsbakteriologie. 2.Auflage.
P. Parey, Berlin 1926, S. 75
- 22 H e s s e , W. : Ein neuer Kulturgefäßverschluß.
Zbl. Bakt. I Orig. 27, 258 (1900)
- 23 H o h n , J. : Zur Frage des Verschlusses der Eiröhrchen bei der Tuberkelbakterienkultur.
Zbl. Bakt. I Orig. 130, 457 (1933-34)
- 24 H o w a r d , D. H. : The preservation of bacteria by freezing in glycerol broth.
J. Bact. 71, 625 (1956)
- 25 H u s s , H. : Ein vorteilhafter Schutz des Nährbodens gegen Austrocknung.
Zbl. Bakt. I Orig. 111, 498 (1929)
- 26 J u n a c k , M. : Der Platten- und Nährbodensperer.
Berl. tierärztl. Wschr. 18, 470 (1932)
- 27 K a h l f e l d , Fr. : Bakteriologische Nährbodentechnik.
G. Thieme, Leipzig 1943
- 28 K a p s e n b e r g , G. : Eine Kulturkappe anstelle des Wattepfropfens.
Zbl. Bakt. I Orig. 146, 80 (1941)
- 29 K a s p a r e k , Th. : Ein einfacher Luftabschluß flüssiger Nährböden beim Kultivieren anaerober Bakterien.
Zbl. Bakt. I Orig. 20, 536 (1896)

- 30 K a s p a r e k , Th. : Ein einfacher Reagenzröhrchen-
verschluss ohne Wattestopfen.
Zbl. Bakt. I Orig. 79, 318 (1917)
- 31 K a u f f m a n n , F. : Enterobacteriaceae. 2 Ed.
E. Munksgaard, Copenhagen 1954
- 32 K i r s t e i n , F. und F l e i s c h e r , M. : Eine
einfache Methode zur längeren Konservierung von empfind-
lichen Bakterienkulturen, insbesondere von Gono- und
Meningokokken.
Zbl. Bakt. I Orig. 141, 201 (1938)
- 33 K i s s k a l t , K. und B e r e n d , E. : Unter-
suchungen über die Gruppe der Diphtheroiden (Coryne-
bakterien).
Zbl. Bakt. I Orig. 81, 444 (1918)
- 34 K n o r r , M. : Beiträge zu bakteriologischen Kultur-
methoden.
Zbl. Bakt. I Orig. 86, 319 (1921)
- 35 K o v a c s , W. : A Micromethod for Detecting Indol
Formation.
J. of Clin. Path. 12, 90 (1959)
- 36 v o n K o v á t s , Fr. : Schutz der Bakteriennährböden
mittels Paraffinscheiben gegen Austrocknung.
Dtsch. med. Wschr. 51, 1822 (1925)
- 37 K r á l , F. : Weitere Vorschläge und Anleitung zur
Anlegung von bakteriologischen Museen.
Zschr. Hyg. 5, 497 (1889)
- 38 L e n t z , O. : Ein neues Verfahren für die Anaeroben-
züchtung.
Zbl. Bakt. I Orig. 53, 360 (1910)
- 39 L i n d n e r , F. : Mikroskopische und biologische Be-
triebskontrolle in den Gärungsgewerben.
P. Parey, Berlin 1930
- 40 L ö w e n s t e i n , E. : Die Züchtung der Tuberkel-
bazillen aus dem strömenden Blute.
Zbl. Bakt. I Orig. 120, 127 (1931)
- 41 L ö w i , E. : Verschlusshülsen für Kulturröhrchen und
Vorratsgefäße zur Verhinderung der Verdunstung.
Zbl. Bakt. I Orig. 81, 493 (1918)
- 42 L u m i è r e , A. et C h e v r o t i e r , J. : Sur
la vitabilité des cultures de gonocoques.
C. R. S. Acad. Sci. 158 I. 1820 (1914)

- 43 M e i s s n e r , G. : Bakterizide und entwicklungshemmende Wirkung des Blutes auf Tuberkelbazillen.
Zbl. Bakt. I Orig. 106, 210 (1928)
- 44 M i c h a e l , M. : Konservierung schwer haltbarer Bakterienkulturen, insbesondere des Gonokokkus.
Zbl. Bakt. I Orig. 86, 507 (1921)
- 45 M o u r i z , J. : Ein Beitrag zur bakteriologischen Diagnostik der Tuberkulose.
Klin. Wschr. 48, 2249 (1930)
- 46 M ü l l e r , R. : Verschuß von Kulturgefäßen und Nährbodenbehältern.
Münch. med. Wschr. 56, 886 (1909)
- 47 P a r i s h , H. J. : Preservation of cultures under liquid paraffin.
J. of Path. 35, 143 (1932)
- 48 P ä t e r , J. : Die Benutzung von Aluminiumdeckeln anstatt von Wattestopfen bei bakteriologischen Arbeiten.
Zbl. Bakt. I Orig. 149, 125 (1942)
- 49 P e t r u s c h k y , J. : Bakterio-chemische Untersuchungen.
Zbl. Bakt. I Orig. 6, 625 (1889)
- 50 P i c k , F. : Der Trichteragar.
Zbl. Bakt. I Orig. 105, 309 (1927/28)
- 51 P o l d i n g , J. B. : A simple method of preserving bacteria dried in vacuo.
J. Path. Bact. 55, 502 (1943)
- 52 R i m p a u , W. : Die Leptospirose.
Urban und Schwarzenberg, München - Berlin 1950 S.20
- 53 R o e m e r , G. B. und S c h m i t z , B. : Untersuchungen über die Eignung verschiedener Methoden zur Differenzierung pathogener und apathogener Staphylokokken.
Arch. Hyg. 135, 279 (1951)
- 54 S c h i l l : Beiträge zur bakteriologischen Technik.
Zbl. Bakt. I Orig. 10, 657 (1891)
- 55 S c h m i e d e l , A. : Ein Gummikappenverschluß für Kulturen des Mycobacterium tuberculosis.
Zbl. Bakt. I Orig. 166, 150 (1956)
- 56 S e e l e m a n n , M. : Biologie der Streptococcen.
Hans-Carl Nürnberg 1954
- 57 S e i d e l , G. : Eine Mikromethode zur Einsparung bei der Bunten Reihe.
Mh. Vet. Med. 12, 254 (1953)

- 58 S e i f f e r t , G. : Die Diagnose pathogemer Bakterien mit der Mikromethode.
Münch. med. Wschr. 64, 94 (1917)
- 59 S e i t z : Paraffin-Dauerpfropf.
Zbl. Bakt. I Orig. 83, 607 (1919)
- 60 S o y k a , J. : Über ein Verfahren, Dauerpräparate von Reinkulturen auf festen Nährböden herzustellen.
Zbl. Bakt. I Orig. 1, 542 (1887)
- 61 S o y k a , J. und K r ä l , F. : Vorschläge und Anleitungen zur Anlegung von bakteriologischen Museen.
Zschr. Hyg. 4, 143 (1888)
- 62 S t u r g e s , W. S. : Flattened capillary tubing for microscopic examination of cultures.
J. Inf. Dis. 42, 444 (1928)
- 63 S t u t z , L. : Über die Verwendungsmöglichkeit des Cellophans in der Bakteriologie.
Zbl. Bakt. I Orig. 139, 110 (1937)
- 64 S ü t t e r l i n , Th. : Die Züchtung der Tuberkelbazillen nach Hohn.
Münch. med. Wschr. 28, 1180 (1927)
- 65 T r u c h e , C. : Moyen simple et pratique de conservation des germes.
Ann. Inst. Pasteur 38, 516 (1924)
- 66 U n g e r m a n n , E. : Eine einfache Methode zur Gewinnung von Dauerkulturen empfindlicher Bakterienarten und zur Erhaltung der Virulenz tierpathogener Keime.
Arbeiten aus dem Reichsgesundheitsamt 51, 180 (1919)
- 67 W ä m o s c h e r , L. und V á s á r h e l y i , J. : Methode zur Einzellkultur von anaeroben Bakterien im hängenden Tropfen.
Zbl. Bakt. I Orig. 123, 250 (1931)
- 68 W e i n b e r g , M. et S é g u i n , P. : Le B. oedematiens et la gangrène gazeuse.
C. r. Soc. de Biol. 78, 508 (1915)
- 69 W e s s e l i n o f f , W. : Beitrag zur Rationalisierung der Bunten Reihe durch Mikropipetten.
Wien. tierärztl. Mtsschr. 35, 605 (1948)
- 70 W r i g h t , A. E. : On some new methods, devices and apparatus for the routine and the research laboratory.
Lancet 1926 I, 4
- 71 W o r a t z , H. : Erleichterung der Laboratoriumstechnik durch knetbare Massen.
Dtsch. med. Wschr. 84, 541 (1950)

Herrn Prof. Dr. Bernhard Schmidt möchte ich für die Annahme der Arbeit danken. Seine menschliche Anteilnahme und die wissenschaftliche Strenge dieses ärztlichen Hochschullehrers werden mir Vorbild sein.

Herrn Dr. Lenk danke ich für die konziliante Art, mit der er wissenschaftliche Hinweise gab und technische Erleichterungen ermöglichte. Seine freundliche und entgegenkommende Einstellung wirkte sich für mich sehr fördernd auf den Abschluss der Versuche aus.

Lebenslauf

Am 4. 11. 1919 wurde ich in Insel Kreis Stendal geboren. Nach vierjähriger Grundschulzeit besuchte ich von 1930 bis 1938 das Gymnasium zu Stendal, an dem ich das Abitur ablegte. Nach längerer Unterbrechung des Studiums durch Wehrdienstleistung konnte ich 1950 das Staatsexamen an der vet. med. Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin ablegen; hier promovierte ich 1952 zum Doktor med. vet.. Nach mehjähriger tierärztlicher Tätigkeit, z.T. als wissenschaftlicher Assistent am Institut für Vet.-Hygiene und als wissenschaftlicher Oberassistent am Institut für Lebensmittelhygiene der Humboldt-Universität, nahm ich das Medizinstudium an der Humboldt-Universität auf und legte daselbst 1958 das medizinische Staatsexamen ab. Die Pflichtassistentenzeit leistete ich am Tbc.-Forschungsinstitut in Berlin-Buch, an der Inneren Abteilung des Krankenhauses Berlin-Friedrichshain und an der Chirurgischen Abteilung des Krankenhauses Berlin-Pankow ab. Danach war ich an der Chirurgischen Abteilung des Urban-Krankenhauses in Berlin-Kreuzberg und an der Inneren Abteilung des Krankenhauses Berlin-Gatow als Stationsarzt tätig.

